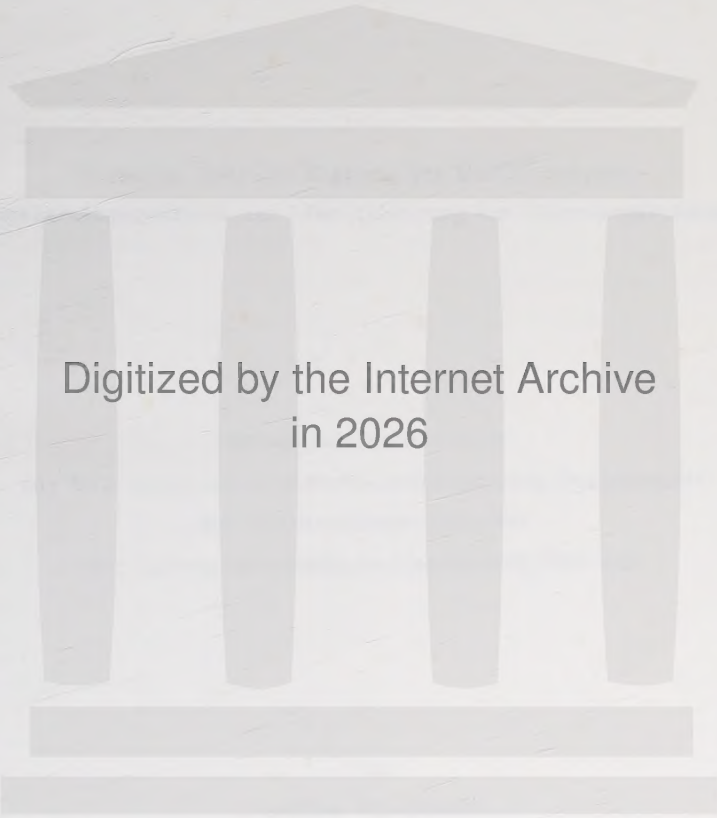


**Versuche über die Eignung des
Biofluoreszenzspektralanalysators zur
Identifizierung von Mikroorganismen**

Joachim Pflughaupt

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0044

Aus dem Bereich Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs der Universität München

- Tierärztliche Fakultät -

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h. c. L. Kotter und Prof. Dr. G. Terplan

Versuche über die Eignung des Biofluoreszenz-
spektralanalysators zur Identifizierung von Mikroorganismen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Joachim Pflughaupt
aus Dresden

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H. G. Buschmann

Tag der Promotion: 26. Juli 1974



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Beobachtungen, die zur Entwicklung des Biofluoreszenzspektralanalysators führten	2
2.2. Fluoreszenzfarbstoffe	4
2.2.1. Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	5
2.2.2. 1-Dimethylaminonaphthalin-5-Sulfonylchlorid (DANS)	5
2.2.3. Acridinorange (AO)	6
2.3. Reinigung von Konjugaten vom nichtgebundenen Farbstoff	7
3. Eigene Untersuchungen	8
3.1. Material und Methoden	8
3.1.1. Beschreibung des Biofluoreszenzspektralanalysators (BIFSA)	8
3.1.2. Versuche mit freien Fluoreszenzfarbstoffen	9
3.1.3. Versuche mit organischen Substanzen	10
3.1.3.1. Herstellung der Konjugate durch Anfärbung mit FITC	11
3.1.3.2. Herstellung der Konjugate durch Anfärbung mit DANS	12
3.1.3.3. Herstellung der Konjugate durch Anfärbung mit AO	12
3.1.4. Versuche mit Bakterien	13
3.1.4.1. Anfärbung abgetöteter Bakterien	15

3.1.4.1.1.	Herstellung der Präparate mittels Gel-filtration als Reinigungsverfahren	15
3.1.4.1.2.	Herstellung der Präparate mittels Aktivkohle als Reinigungsverfahren	18
3.1.4.2.	Anfärbung lebender Bakterien	21
3.1.4.2.1.	Vitalfärbung	21
3.1.4.2.2.	Supravitalfärbung	22
3.1.4.3.	Versuche mit Bakterienstoffwechselprodukten (Enterotoxin)	23
3.2.	Ergebnisse	24
3.2.1.	Ergebnisse der Versuche mit freien Fluoreszenzfarbstoffen	25
3.2.2.	Ergebnisse der Fluorochromierung organischer Substanzen	26
3.2.3.	Fluorochromierung von Bakterien	27
3.2.3.1.	Emissionsspektren der abgetöteten Bakterien	27
3.2.3.2.	Emissionsspektren lebender Bakterien	30
3.2.3.3.	Emissionsspektren der Bakterienstoffwechselprodukte	30
4.	Diskussion	31
5.	Zusammenfassung	38
	Summary	40
6.	Literaturverzeichnis	42

1. Einleitung

Die Untersuchung der Lebensmittel auf pathogene und verderbniserregende Mikroorganismen wird immer mehr intensiviert. In diesem Zusammenhang finden Schnellnachweise besonderes Interesse.

Zur raschen Identifizierung einiger Bakterien ist die Immunfluoreszenz schon beinahe als Routineverfahren anzusprechen. Die Spezifität dieser Nachweismethode liegt in der Antigen-Antikörperreaktion, die durch Fluoreszenz ihren Ausdruck findet.

In der vorliegenden Arbeit soll nun nachgewiesen werden, ob nicht auch eine Bakterienidentifizierung durch eine direkte Anfärbung der Bakterien mit einem Fluoreszenzfarbstoff möglich ist, indem die spektrale Zusammensetzung des emittierten Lichtes dieser angefärbten Bakterien ausgewertet wird. Die Möglichkeit dieser Auswertung liefert der Biofluoreszenzspektralanalysator (BIFSA), der noch unter Punkt 3.1.1. näher beschrieben wird.

Zur Durchführung der Arbeit liegt die Vorstellung zugrunde, daß nicht nur komplexes Material, wie es die Bakterien darstellen, untersucht werden soll, sondern auch weitgehend reine Substanzen wie Eiweiße, Zucker und Nucleinsäuren, die gewissermaßen als Modellsubstanzen für Bausteine der Bakterienzelle eingesetzt werden.

2. Literatur

2.1. Beobachtungen, die zur Entwicklung des Biofluoreszenzspektralanalysators (BIFSA) führten.

Voraussetzung für die Entwicklung des Gerätes war die Beobachtung, daß verschiedene organische Substanzen und Zellstrukturen nach Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff ein unterschiedliches Emissionsspektrum zeigen.

WEBER (1952) färbte bovines Serumalbumin, Ovalbumin und Polylysine mit 1-Dimethylaminonaphthalin-5-Sulfonylchlorid (DANS) an. Diese Konjugate zeigten ein bemerkenswert voneinander abweichendes Absorptionsspektrum. Da im allgemeinen eine Spiegelsymmetrie zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum besteht (LEWSCHIN; 1931 und KRIEG; 1953) ist dementsprechend auch zu vermuten, daß die oben angeführten Konjugate ein unterschiedliches Emissionsspektrum zeigen würden.

ARMSTRONG (1956) konnte nach Anfärbung mit Acridinorange (AO) Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure sowohl in histologischen Schnitten, als auch in isolierter Form voneinander unterscheiden, indem DNA eine gelbe und RNA eine leuchtend rote Fluoreszenz zeigten. SCHÜMMELFEDER, EBSCHNER und KROGH (1957) führten diese differente Darstellung der Nukleinsäuren auf ihren unterschiedlichen Polymerisationsgrad zurück. MAC INNES und McCLINTOCK (1970)

konnten sogar Differenzen der Fluoreszenzspektren von AO-DNA-Komplexen nach Zusammensetzung der DNA-Basen nachweisen. Anhand einer außerordentlich empfindlichen Meßtechnik beobachteten sie eine Verschiebung des Emissionsspektrums in den kurzwelligen Bereich, wenn der Gehalt der DNA an Cytosin-Guanin-Basenpaaren zunimmt.

In der Histologie stellt die Fluorochromierung zur Untersuchung von Gewebeschnitten verschiedenen Ursprungs ein wichtiges Hilfsmittel dar (SCHÜMMELFEDER, 1950; HAMPERL, 1955; HICKS und MATTHAEI, 1955 und DARKEN, 1961). Als geeignetes Fluorochrom hat sich dabei besonders AO erwiesen. Die unterschiedliche Anfärbbarkeit und die damit variierende Fluoreszenzfarbe lassen nicht nur eine Unterscheidung von beispielsweise Zellen des Herzmuskels und des Interstitiums zu, sondern erlauben auch einen Rückschluß auf bestimmte Typen von Krebszellen.

Auf dem Gebiet der Bakteriologie sind besonders die Arbeiten von STRUGGER (1942, 1943) sehr informativ. Er stellte fest, daß durch die Acridinorange-Färbung verschiedene Zustände des Plasmaeiweißes sichtbar gemacht werden können. Natives Eiweiß, das heißt Plasmaeiweiß einer lebenden Zelle fluoresziert grün, während denaturiertes Plasmaeiweiß rot fluoresziert. Nicht nur die Extreme Lebend und Tod lassen sich mit dieser Methode analysieren, sondern auch dazwischenliegende Schädigungsstadien (SCHÜMMELFEDER, 1950).

Mit Hilfe der Vitalfärbung mit AO konnte SCHULER (1952) am Beispiel des "Bacterium coli" unterschiedliche Chromatinstrukturen in Abhängigkeit vom Alter der Bakterien nachweisen. LI HUI et al, (1964) klärten mit Hilfe des unterschiedlichen optischen Verhaltens der AO die Feinstruktur des Protoplasmas von *Proteus vulgaris* auf. Diese Differenzierungsmöglichkeiten wurden von STRUGGER (1943) als Konzentrations-effekt des Farbstoffes AO bei der elektrostatischen Adsorption der Farbstoffkationen im Zellplasma angedeutet, indem z.B. das Protoplasma toter Zellen viel Farbstoff speichert und kupferrot fluoresziert, während dasjenige lebender Zellen relativ wenig Farbstoff aufnimmt und deshalb eine grüne Fluoreszenz zeigt. Bisherige Versuche mit dem Gerät BIFSA zur Identifizierung von Bakterien anhand ihres unterschiedlichen Spektralverhaltens, führten zu verschiedenen Aussagen. Einerseits wurde seine Eignung völlig verneint (persönliche Mitteilung THON), andererseits wurde nicht ausgeschlossen, daß das dem Gerät zugrunde liegende Prinzip für eine Identifizierung von Keimen doch weiter entwickelt werden kann (persönliche Mitteilung BÖHM).

2.2. Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Durchführung der Fluoreszenzversuche werden zur Anfärbung sowohl der organischen Substanzen als auch der Bakterien verschiedene Farbstoffe benutzt. Die Konjugation eines Farbstoffes an einen Träger geschieht nur unter bestimmten Bedingungen, die sich bei den einzelnen Fluorochromen besonders

in Bezug auf Reaktionszeit und pH-Wert wesentlich unterscheiden.

2.2.1. Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)

FITC findet hauptsächlich seine Anwendung in der Markierung von Antikörpern bei serologischen Nachweisverfahren. Die chemisch reaktive Gruppe ist das Isothiocyanat. Nach FOTHERGILL (1969) wird die Koppelung von FITC an Proteine am besten bei einem pH-Wert von 9,0 (Karbonat-Bikarbonat-Puffer 0,5 M) durchgeführt. Eine 75 %ige Farbstoffumsetzung wird nach sechs Stunden und eine 100 %ige nach 24 Stunden erreicht.

2.2.2. 1-Dimethylaminonaphthalin-5-Sulfonylchlorid (DANS)

Dieser Farbstoff diente WEBER (1952) als Markierungssubstanz für seine Studien über die Polarisierung der Fluoreszenz von Makromolekülen. MAYERSBACH (1958) sowie ALBRECHT und SOKOL (1961) berichteten über seine ausgezeichnete Eigenschaft zur Markierung von γ -Globulinen für immunhistologische Zwecke. Sämtliche Autoren stimmen darin überein, daß die beste Anfärbung von Proteinen in einem pH-Bereich von 7,5 - 8,2 erreicht wird. Um die Kristallisation zu vermeiden, und die Reaktion zu beschleunigen, schlägt MAYERSBACH (1958) außerdem noch einen Zusatz an Dioxan vor, der 10 % des Gesamtvolumens betragen soll. Die Reaktion ist im allgemeinen nach sechs Stunden abgeschlossen.

2.2.3. Acridinorange (AO)

Aus der Reihe der Acridinfarbstoffe ist das AO besonders hervorgetreten. Der von STRUGGER (1942, 1943) zuerst entdeckte und beschriebene Konzentrationseffekt wurde von BOERNER-PATZELT (1950) auf seine ursächlichen Faktoren genauer untersucht und in bestimmten Gesetzmäßigkeiten zusammengefaßt. ZANKER (1952, 1952) testete diesen Farbstoff sehr eingehend auf seine physikalisch-chemischen Eigenschaften und kam unter anderem zu folgenden Ergebnissen :

Das AO-Molekül liegt in Abhängigkeit vom pH-Wert in vier verschiedenen Formen vor. Bei pH-Werten über 11 ist das Molekül neutral, während im Bereich von 6,5 - 11 sowohl das neutrale als auch das einwertige Kation vorliegen, welches von pH 1,5 - 6,5 allein in Lösung vorhanden ist. Bei pH-Werten unter 1,5 liegt der Farbstoff schließlich als 2- und 3- wertiges Kation vor. Im neutralen, für die biologische Anfärbung interessanten Bereich, existiert also das 1- wertige Farbstoffkation, welches je nach Konzentration in verschiedenen Polymerisationsstufen vorliegt. Bei Konzentrationen kleiner als 5×10^{-5} molar sind monomere und dimere Ionen vorherrschend, während bei steigender Konzentration höhere Polymerisate vorliegen. Das Emissionsspektrum des AO variiert sowohl mit dem pH-Wert als auch mit dem Aggregationszustand. Im Gegensatz dazu hat die Temperatur im Normalbereich nur einen geringfügigen Einfluß auf das optische Verhalten des Farbstoffes. Erst bei extrem niedrigen Temperaturen (minus 175° Celsius) ändert sich sein Absorptions- und Emissionsspektrum.

2.3. Reinigung von Konjugaten vom nichtgebundenen Farbstoff

Um die Spezifität der Emissionsspektren für ein bestimmtes, mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbtes Substrat zu garantieren, ist es von größter Bedeutung, daß die Konjugate frei von jedem überschüssigen Farbstoff sind. Als Reinigungsmethode bietet sich die Gelfiltration an, die besonders in der Immunfluoreszenz zur Herstellung von spezifisch angefärbten Antikörpern Anwendung findet (NAIRN, 1969 ; WAGNER, 1967).

Mit dem Typ Sephadex G 25 coarse ist auf diese Weise auch eine Reinigung der Bakterien vom überschüssigen Farbstoff möglich (PITAL et al., 1966).

Eine weitere Methode ist die Reinigung der Konjugate mittels Aktivkohle (NAIRN, 1969). Ihr Nachteil, daß durch die "van der Waalsche Adsorption" (HESSE und SAUTER, 1947) nicht nur der freie Farbstoff, sondern auch zum Teil die Konjugate adsorbiert werden, kann dadurch weitestgehend verhindert werden, daß kleinste Mengen an Aktivkohle benutzt werden (NAIRN, 1964). Wie die Arbeiten von CHADWICK et al., (1959; 1960) zeigen, wird durch die Aktivkohle nicht nur der freie, sondern auch der schwachgebundene Farbstoff extrahiert.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Beschreibung des Biofluoreszenzspektralanalysators (BIFSA)

Das Gerät wurde von der Firma Messerschmitt-Bölkow-Blohm GmbH München entwickelt. Es besteht aus einem Fluoreszenz-auflichtmikroskop mit einer Xenonhochdrucklampe 75 W (XBO 75 der Firma Zeiss) als Lichtquelle. Erregerfilter ist ein 2 mm UG 1 und Sperrfilter ein TK 400/K 430. Die Objektiv-vergrößerung ist 6,3fach. Das von dem Präparat ausgestrahlte Fluoreszenzlicht wird in der Objektivebene durch ein mit konstanter Geschwindigkeit rotierendes Filterrad in seine einzelnen Spektralbereiche zerlegt. In das Filterrad sind 17 Filter eingebaut, die folgende Durchlässigkeitsmaxima haben und somit das Fluoreszenzspektrum in die entsprechenden Kanäle zerlegen :

Nr. 1	-	404 nm	Nr. 10	-	582 nm
Nr. 2	-	417 nm	Nr. 11	-	601 nm
Nr. 3	-	443 nm	Nr. 12	-	621 nm
Nr. 4	-	458 nm	Nr. 13	-	642 nm
Nr. 5	-	477 nm	Nr. 14	-	660 nm
Nr. 6	-	499 nm	Nr. 15	-	679 nm
Nr. 7	-	524 nm	Nr. 16	-	707 nm
Nr. 8	-	542 nm	Nr. 17	-	718 nm
Nr. 9	-	559 nm			

Über einen Photomultiplier wird die Lichtintensität der einzelnen Spektralbereiche registriert und als Signal auf die entsprechenden Kanäle eines Oszillographen weitergeleitet. Dadurch erscheint das Emissionsspektrum auf dem Oszillographen in Form einzelner Peaks, deren Vielzahl sich nach der Spektralbreite des vom Präparat emittierten Lichtes richtet und deren Höhe durch die Lichtintensität in dem betreffenden Spektralabschnitt festgelegt ist. Zur Nivellierung der Kurvenbilder auf dem Oszillographen ist zwischen diesem und dem Photomultiplier ein Kleincomputer eingeschaltet. An dieser Stelle soll aber schon gesagt werden, daß die Empfindlichkeit dieses Gerätes weit unterhalb der Fluoreszenzintensität der meisten Präparate lag. Um dennoch vergleichbare Kurvenbilder zu erhalten, wurde für die einzelnen Präparate die Photomultiplervorspannung geändert und bei den betreffenden Abbildungen vermerkt. Die Kurvenbilder wurden photographisch festgehalten und in einer Beilage der Arbeit zusammengefaßt. ^{x)}

3.1.2. Versuche mit freien Fluoreszenzfarbstoffen

Um den Konzentrationseffekt des AO zu verdeutlichen, wird von den Fluoreszenzfarbstoffen AO und FITC jeweils eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationsstufen hergestellt :

0,0005 % ; 0,008 % ; 0,032 % ; 0,063 % ; 0,125 % und 1 %.

^{x)} Siehe Fußnote Seite 24

Dabei werden AO in Phosphat-Puffer pH 7,2 und FITC in Karbonat-Bikarbonat-Puffer pH 9,0 gelöst. Die beiden Puffer werden deshalb als Lösungsmittel ausgewählt, weil sie auch bei den folgenden Versuchen zur Anfärbung der organischen Substanzen und Bakterien mit AO bzw. FITC als Lösungsmittel dienen. Von den einzelnen Verdünnungsstufen werden vier Tropfen auf einen Hohlsliffobjektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen.

3.1.3. Versuche mit organischen Substanzen

Folgende, aus dem Handel erworbene organische Substanzen werden für die Untersuchungen herangezogen :

Albumin aus Rinderserum

α -Globulin aus Rinderserum

β -Globulin aus Schweineserum

γ -Globulin aus Rinderserum

Ovalbumin

Poly-L-Lysin, hochmolekular

Glykogen aus Miesmuschel

RNS, niedermolekular aus Hefe

3.1.3.1. Herstellung der Konjugate durch Anfärbung mit FITC

100 mg der organischen Substanz werden in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Dazu werden 4 ml 0,5 m Karbonat-Bikarbonat-Puffer pH 9,0 gegeben. Weitere 3 ml dieses Puffers dienen zur Auflösung von 5 mg FITC. Die Anfärbung geschieht durch tropfenweises Hinzugeben der FITC-Lösung unter stetigem Rühren. Bis zur vollständigen Konjugation verbleibt die Lösung sechs Stunden lang in einem Kühlraum.

Die Reinigung der Konjugate von dem überschüssigen Farbstoff geschieht durch Gelfiltration mit Sephadex G 50. Die Höhe der Säule beträgt etwa 25 cm und ihr Durchmesser 3 cm. Zum Nachspülen dient der Karbonat-Bikarbonat-Puffer. Die Konjugate erscheinen in der ersten Fraktion. Die Filtration wird in einem Kühlraum durchgeführt. Die gereinigten Konjugate sind durch Gelfiltration ungefähr auf das Doppelte verdünnt, daher werden sie durch Vakuumdialyse gegen phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS = phosphate-buffered-saline) pH 7,2 auf einen Standardwert von 2 ml, entsprechend 5 %ige Substratlösung, konzentriert. Von diesen Lösungen werden vier Tropfen auf einen Hohlschliffobjektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen.

3.1.3.2. Herstellung der Konjugate durch Anfärbung mit DANS

100 mg der organischen Substanz werden in 10 ml PBS pH 7,5 gelöst. Um ein Ausfällen des Substrates zu vermeiden, werden unter mäßigem Rühren bei einer Temperatur von etwa 4°C 1 ml Dioxan und 1 ml 0,5 %iger acetonischer DANS-Lösung tropfenweise hinzugefügt. Bis zur vollständigen Anfärbung, was durch den Umschlag der anfänglich milchig trüben Lösung zur vollkommenen Klärung angezeigt wird, bleibt die Lösung unter weiterem Rühren sechs Stunden in einem Kühlraum.

Die Reinigung und die Konzentrierung mittels Dialyse geschieht auf die gleiche Weise wie bei den FITC-Konjugaten. Bei der Gelfiltration ist jedoch zu beachten, daß die Wanderung der optisch farblosen DANS-Konjugate nur bei UV-Licht beobachtet werden kann.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, werden sowohl bei der FITC- als auch bei der DANS-Anfärbung von den einzelnen Substraten jeweils drei Präparate hergestellt.

3.1.3.3. Herstellung der Konjugate durch Anfärbung mit AO

Jeweils 100 mg der organischen Substanz werden in 5 ml Phosphat-Puffer mit den pH-Werten 6,1 ; 7,2 und 8,4 gelöst. Weitere 5 ml des Puffers mit den entsprechenden pH-Werten werden zur Herstellung einer 0,01 %igen AO-Lösung verwendet, die tropfenweise der Substrat-Lösung unter Rühren hinzugegeben

wird. Selbst bei Herabsetzung der Farbkonzentration bis auf 0,0003 % bewirkt die Zugabe des Farbstoffes zu der Substrat-Lösung einen Niederschlag der organischen Substanzen, der eine Reinigung durch Gelfiltration unmöglich macht.

3.1.4. Versuche mit Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden für die Untersuchungen ausgewählt:

Streptococcus

Sc. bovis

Sc. durans

Sc. faecalis

Staphylococcus

St. aureus ein Institutsstamm, sowie die Stämme

361 (Bergdoll et al., 1965)

604

ATCC 14458

246 (Casman u. Bennett, 1963)

Pseudomonas

Ps. aeruginosa

Ps. fluorescens

Bacillus

B. cereus

B. subtilis

Pasteurella

P. multocida

P. haemolytica

Corynebacterium

C. pyogenes

C. equi

Lactobacillus

Lb. buchneri

Lb. plantarum

Enterobacteriaceae

E. coli

S. gallinarum

S. paratyphi

Pr. vulgaris

Sämtliche Stämme wurden aus der Institutssammlung entnommen.

3.1.4.1. Anfärbung abgetöteter Bakterien

In einer Reihe von Vorversuchen wird zunächst getestet, bei welchem pH-Wert sich die mit verdünnter Formalinlösung abgetöteten Keime am besten mit AO anfärben lassen. Zu diesem Zweck werden verschiedene Bakterienstämme bei pH-Werten von 3,3 ; 6,1 ; 7,2 und 9,5 (eingestellt mit Phosphat-Puffer) mit 10 ml einer 0,01 %igen AO-Lösung angefärbt. Durch fünfmaliges Waschen mit dem entsprechenden Puffer wird der überschüssige Farbstoff entfernt. Dabei stellt sich heraus, daß bei dem pH-Wert von 7,2 die angefärbten Bakterien das breiteste Emissionsspektrum zeigen und somit eine größere Variation in den Kurvenbildern zulassen.

3.1.4.1.1. Herstellung der Präparate mittels Gelfiltration als Reinigungsverfahren

Die auf dem Plate Count Agar (Oxoid CM 325) angezüchteten Bakterienstämme, mit Ausnahme der Pasteurellen, die auf Blutagar angezüchtet werden müssen, werden in 100 ml Brain Heart Infusion (Oxoid CM 225) überimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach Zugabe von 5 ml einer 4 %igen Formalinlösung und Einwirkungszeit von mindestens 12 Stunden, wobei die Sporenbildner weiterhin bei 37°C gehalten werden müssen, um ein Aussporen derselben zu bewirken, sind die Keime restlos abgetötet. Ein für die Bakterieneiweiße

schonenderes Abtötungsverfahren durch die Einwirkung von Chloroformdämpfen wie es ABBOTT und SHANNON (1958) für Micrococcaceae durchführten, läßt sich nicht erfolgreich auf alle verwendeten Bakterienstämme übertragen, da es sich herausstellte, daß einige Stämme z.B. die Bacillus-Keime ihre Vitalität dadurch nicht verloren.

Nach Abzentrifugation und zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wird das Sediment in 10 ml PBS (pH 7,2) mit einem Zusatz von 0,01 % AO resuspendiert. Zur vollständigen Anfärbung verbleibt die Lösung unter leichtem Rühren eine halbe Stunde lang in einem Kühlraum. Danach wird die Bakteriensuspension durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 coarse gereinigt, wobei zum Nachspülen PBS (pH 7,2) dient. Die Bakterien erscheinen in der ersten Phase. Um den Verlauf der Phase überhaupt verfolgen zu können, ist eine sehr große Bakterienmenge notwendig; daher erklärt sich auch die Bebrütung in 100 ml Brain Heart Infusion.

Das Keimmaterial ist außerdem groß genug, daß es nach Zentrifugation über eine Analysenwaage gewichtsmäßig erfaßt werden kann. Nach Einwaage des Zentrifugenglases werden die Bakterien abzentrifugiert (20 min bei 3000 U/min). Der Überstand wird sorgfältig dekantiert und durch Auswaage des Zentrifugenglases mit dem Sediment, wird das Gewicht der Bakterienmenge bestimmt. Mit PBS (pH 7,2) wird eine Endkonzentration von 20 mg Sediment pro ml eingestellt.

Zur Bestimmung des Emissionsspektrums mit dem Gerät BIFSA werden vier Tropfen der Suspension auf einen Hohl-schliffobjektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen.

Für die Anfärbung der Bakterien mit FITC und DANS werden die Keime auf die gleiche Weise bebrütet und gewaschen. Die Anfärbung mit FITC und das Nachspülen bei der Gelfiltration erfolgen jedoch mittels Karbonat-Bikarbonat-Puffer pH 9,0.

Zur Anfärbung mit dem Farbstoff DANS werden die Bakterien nach dem Waschen in 10 ml PBS pH 7,2 suspendiert und durch Zugabe von 1 ml einer 0,1 %igen acetonischen DANS-Lösung angefärbt. Bei diesem Farbstoff ist, wie schon erwähnt, zu beachten, daß der Phasenverlauf durch die Sephadexsäule nur bei UV-Licht beobachtet werden kann.

Die Anfärbungszeit beträgt für beide Farbstoffe sechs Stunden. Da die Kurvenbilder der Emissionspektren (für FITC und DANS getrennt gesehen) nach Anfärbung verschiedener Bakterienstämme völlig einheitlich sind, werden diese beiden Farbstoffe nicht mehr für weitere Versuche herangezogen.

3.1.4.1.2. Herstellung der Präparate mittels Aktivkohle als Reinigungsverfahren

Die Bakterienstämme werden, wie unter vorhergehender Ziffer beschrieben, angezüchtet, gewaschen und abgetötet. Da zu ihrer Vermehrung nur 10 ml Brain Heart Infusion verwendet werden, reicht zur Abtötung der Keime 1 ml der 4 %igen Formalin-Lösung aus. Nach Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes werden die Bakterien in 10 ml PBS pH 7,2 mit einem Zusatz von 0,01 % AO gelöst und unter ständigem mäßigem Rühren eine halbe Stunde lang angefärbt. Danach werden, ohne das Rühren zu unterbrechen, 4 mg pulverisierte Aktivkohle hinzugegeben.

Vorversuche zeigten, daß mindestens 4 mg Aktivkohle erforderlich sind, um bei einer Einwirkungszeit von einer Stunde 10 ml einer 0,01 %igen AO-Lösung vollständig zu entfärben. Nach Abfiltration der Aktivkohle werden die Bakterien aus dem Filtrat abzentrifugiert. Bei einigen der verwendeten Bakterienstämme (z.B. *Sc. durans*, *C. pyogenes* und *St. aureus*) ist die Adsorptionskraft der Kohle jedoch so stark, daß die Keime im Filtrat nicht mehr nachweisbar sind.

Von der Überlegung ausgehend, daß in einem über Aktivkohle geleiteten Flüssigkeitsstrom die freien Farbstoffmoleküle von der Kohle adsorbiert werden, während die Bakterien von dem Strom mitgerissen werden, wird das Reinigungsverfahren daher mit Aktivkohle auf folgende Weise durchgeführt:

Eine Chromatographiesäule (60 x 3 cm) wird bis auf eine Höhe von ungefähr 25 cm mit gekörnter Aktivkohle ($\varnothing$ 1,5 mm) beschickt, deren Oberfläche mit einer 2 -3 cm hohen Schicht von Glasperlen abgedeckt wird. Der Auslaufstutzen der Säule wird durch die Bohrung eines Gummistopfens in ein Zentrifugenglas (Fassungsvermögen ca. 50 ml) geführt. Über einen Verbindungsschlauch wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe für den nötigen Unterdruck gesorgt (Abbildung 1). Hierdurch kommt es zu einem beschleunigten Durchfluß der auf die Aktivkohle aufgetragenen Bakteriensuspension. Vor dem Aufbringen des Materials muß die Aktivkohle jedoch durch häufiges Durchspülen mit Aqua dest. und PBS sorgfältig von anhaftenden Staubteilchen befreit werden.

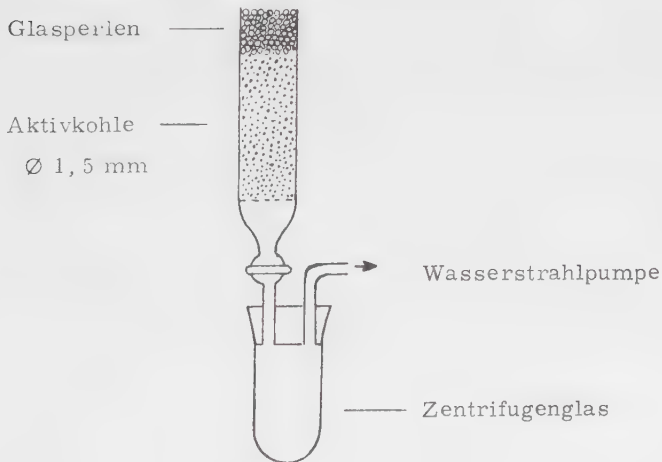


Abb. 1 Vorrichtung zur Reinigung der angefärbten Mikroorganismen von überschüssigem Farbstoff mittels Aktivkohle.

Für jeden Bakterienstamm muß die Säule mit neuer Aktivkohle beschickt werden, da selbst nach intensivstem Spülen Mikroorganismen in der Säulenpackung verbleiben und somit die nächste Probe verunreinigen.

Bei einigen Bakterienarten reicht eine einmalige Passage der Suspension durch die Säule zur Entfernung des freien Farbstoffes aus, bei anderen Arten muß das Verfahren zu diesem Zweck jedoch bis zu dreimal wiederholt werden. Um eine vollständige Reinigung zu gewährleisten, werden daher sämtliche Proben dreimal hintereinander durch die Säule geschickt. Nach dieser Reinigung wird durch mikroskopische Keimzählung nach Breed die Keimzahl pro ml (Hauenzählung) bestimmt. Nach Zentrifugation (20 min bei 3000 U/min) wird die Konzentration der Keime mit PBS (pH 7,2) auf ca. 5×10^8 /ml eingestellt.

Zur Abmessung des Emissionsspektrums wird wie bei den vorherigen Versuchen verfahren: 4 Tropfen werden auf einen Hohl-schliffobjektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt.

Wie bereits unter Ziffer 2.2.3. erwähnt, liegt der Farbstoff AO je nach Konzentration in verschiedenen Polymerisationsstufen vor. Bei der bisher benutzten Konzentration von 0,01 % sind hohe Assoziationsstufen vorherrschend. In anschließenden Versuchen an einer begrenzten Auswahl von Bakterienstämmen ist das Verhalten der Emissionsspektren der Bakterien geprüft worden, die mit einer Farbstoffkonzentration angefärbt

wurden, bei der AO in der monomeren und dimeren Form vorliegt. Dies ist bei einer 10^{-5} molaren Konzentration der Fall (entspricht bei einem molekulargewicht von 300g einer 0,0003 %igen Lösung).

Die Bakterienstämme werden auf Plate Count Agar angezüchtet und nach Überprüfung in 10 ml Brain Heart Infusion 24 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Nach Abtötung mit 1 ml einer 4 %igen Formalinlösung, Abzentrifugation und zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung werden die Keime durch Zugabe von 10 ml einer 0,0003 %igen AO-Lösung (gelöst in PBS; pH 7,2) eine halbe Stunde lang angefärbt. Um eine Unterfärbung der Bakterien auszuschließen, werden die Bakterien in einer zweiten Versuchsreihe mit 10 ml derselben AO-Lösung nachgefärbt.

Der freie Farbstoff wird zum einen durch dreimaliges Waschen mit PBS (pH 7,2) und zum anderen mittels Passage durch Aktivkohle (Säule) entfernt. Die Endkonzentration der Keime wird nach einer Breedzählung auf ca. 5×10^8 Keime pro ml eingestellt.

3.1.4.2 Anfärbung lebender Bakterien

3.1.4.2.1. Vitalfärbung

Die auf Plate Count Agar angezüchteten Bakterienstämme wer-

den in 10 ml Brain Heart Infusion, der vor dem Autoklavieren 0,01 % AO zugesetzt wurde, überimpft und 24 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Ein Vorversuch zeigte, daß durch das Autoklavieren die Fluoreszenz von AO nicht eingeschränkt wird. 0,01 % AO als Zusatz zu der Brain Heart Infusion ist die oberste Konzentration, bei der noch ein befriedigendes Keimwachstum festgestellt werden kann.

Nach Bebrütung und dreimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wird das Sediment in 10 ml PBS (pH 7,2) resuspendiert, durch Aktivkohle (Säule) gereinigt und nach einer Breedzählung auf eine Endkonzentration von ca. 5×10^8 Keime pro ml eingestellt.

3.1.4.2.2. Supravitalfärbung

Das Verfahren entspricht dem oben beschriebenen mit dem Unterschied, daß der Farbstoff nicht der Brain Heart Infusion, sondern den 10 ml zur Resuspendierung verwendeten PBS in einer Konzentration von 0,01 % zugegeben wird. Die Bakterien werden eine halbe Stunde lang bei mäßigem Rühren angefärbt. Zur Reinigung und Standardisierung wird wie bei der Vitalfärbung vorgegangen.

3.1.4.3. Versuche mit Bakterienstoffwechselprodukten (Enterotoxin)

Durch diese Versuche soll am Beispiel verschiedener enterotoxinbildender bzw. nicht-enterotoxinbildender Staphylokokkenstämme geklärt werden, ob nach Fluorochromierung der Stoffwechselprodukte Unterschiede in den Emissionsspektren bestehen. Folgende Staphylokokkenstämme werden benutzt:

Stamm 243 (ATCC 14458)

Stamm 246 (CASMAN und BENNET, 1963)

Stamm S 6

Stamm 604

Stamm 243 und S 6 bilden Enterotoxin B, Stamm 246 Enterotoxin A, während Stamm 604 kein Enterotoxinbildner ist. Die einzelnen Stämme werden im "sac-culture-Verfahren" nach DONNELLY et al. (1967) bebrütet. Nach Abzentrifugieren der Keime wird der Überstand, der die Stoffwechselprodukte enthält, lyophilisiert. Die Anfärbung des Lyophilisates mit FITC, Reinigung und Konzentrierung auf die Endkonzentration von 5 % geschieht wie unter Ziffer 3.1.3.1. beschrieben.

3.2. Ergebnisse^x

Zum besseren Verständnis der Beschreibung der einzelnen Kurvenbilder sei hier ein willkürliches Beispiel für das Bild eines Emissionsspektrums in Form einer Skizze dargestellt.

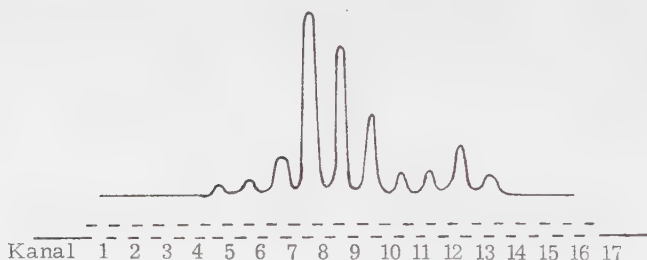


Abb. 2 Skizze eines Emissionsspektrums (willkürliches Beispiel); die Wellenlängen der einzelnen Kanäle sind auf Seite 8 aufgeführt.

^x Die Photographien der Emissionsspektren aus den einzelnen Versuchen sind als Beilage den beiden als Dissertation der Tierärztlichen Fakultät München vorgelegten Exemplaren der Arbeit und einem weiteren, das beim Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch vorliegt, beigelegt. Zur Einsichtnahme kann die Beilage beim o. a. Lehrstuhl angefordert werden.

3.2.1. Ergebnisse der Versuche mit freien Fluoreszenzfarbstoffen

Das Emissionsspektrum des FITC wird durch die Kanäle 6 bis 11 festgelegt, wobei die Intensitätsmaxima je nach Konzentration auf den Kanälen 8 und 9 liegen. Mit steigender Konzentration des FITC wächst die Peakhöhe auf den Kanälen 9 und 10.

Demgegenüber ist das Emissionsspektrum des AO wesentlich umfangreicher. Es reicht von Kanal 3 bis 15. Bei niedrigen Konzentrationen liegen die Intensitätsmaxima auf den Kanälen 8 und 9. Ab Konzentrationen von 0,008 % an erscheint auf dem Kanal 13 ein Peak, der mit zunehmender Konzentration wächst, während gleichzeitig die Peaks auf Kanal 8 und 9 gedämpft werden.

Aufgrund des umfangreichen Emissionsspektrums des AO und seines wechselhaften spektralen Verhaltens bei verschiedenen Konzentrationen, ist dieser Fluoreszenzfarbstoff für die Versuchszwecke am besten geeignet. Zum Anfärben organischer Substanzen konnte er, wie unter Ziffer 3.1.3.3. erwähnt, nicht verwendet werden, da die Zugabe des Farbstoffes stets zu einem Niederschlag der organischen Substanzen führte.

Die Emissionsspektren der FITC- und AO-Lösungen sind in der Abbildungsreihe I der Beilage^x wiedergegeben.

^xSiehe Fußnote von Seite 24

3.2.2. Ergebnisse der Fluorochromierung organischer Substanzen

Die Emissionsspektren verschiedener FITC-Konjugate sind in der Abbildungsreihe II^x der Beilage dargestellt. Es wurden nur die Kurvenbilder derjenigen Konjugate festgehalten, die unterschiedliche Fluoreszenzspektren zeigten.

Der markanteste Unterschied besteht zwischen Glykogen und den Eiweißen. Während das Glykogen sein Intensitätsmaximum auf dem Kanal 8 hat, liegen die Maxima der Eiweiße auf Kanal 8 und 9. Das bedeutet eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums für Glykogen in den kurzwelligen Bereich. Aufgrund der geringen Unterschiede der einzelnen Eiweiße in den Peaks auf Kanal 8 und 9 reichen die Kurvenbilder zur Identifizierung der einzelnen Eiweißtypen nicht aus.

Bei den DANS-Konjugaten zeichnet sich eine vergleichbare Differenz zwischen Eiweißen und Glykogen ab, jedoch ist sie bei weitem nicht so deutlich. Dagegen sind die Emissionsspektren der verschiedenen DANS-Eiweiße untereinander völlig identisch und nur in ihrer Intensität unterschiedlich.

Da die Ergebnisse der DANS-Konjugate mit denen der FITC-Konjugate im Prinzip übereinstimmen und keine neue Aussage ermöglichen, wurde auf ihre Wiedergabe verzichtet.

^x Siehe Fußnote von Seite 24

3.2.3. Fluorochromierung von Bakterien

3.2.3.1. Emissionsspektren der abgetöteten Bakterien

Die Kurvenbilder der Fluoreszenzspektren der mit 0,01 % AO angefärbten und durch Gelfiltration gereinigten Bakterien sind in der Abbildungsreihe III^x dargestellt. Die Emissionsspektren für die verschiedenen Mikroorganismen differieren stark. Wie aus den Emissionsspektren des freien AO zu erwarten ist, liegen die Intensitätsmaxima auf den Kanälen 8, 9 und 13, wobei der Peak auf dem Kanal 13 den größten Schwankungen bei den verschiedenen geprüften Mikroorganismen unterworfen ist. In dem einen Extrem erscheint er gar nicht - wie bei *Pasteurella haemolytica* und *Corynebacterium equi* - im anderen Extrem - wie bei *Staphylococcus aureus* - erreicht er die halbe Höhe des Peaks auf Kanal 9. Allerdings ist es jedoch so, daß der Peak auf Kanal 13 nicht nur kennzeichnend für die meisten Unterschiede unter den einzelnen Bakterienstämmen ist, sondern auch bei Wiederholungen größten Schwankungen unterworfen ist. Dies ist in der Abbildungsreihe an den Beispielen für *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris*, *Corynebacterium pyogenes* und *Escherichia coli* verdeutlicht. Bei den beiden zuletzt genannten Keimen verschiebt sich sogar der Peak vom Kanal 13 zum Kanal 12.

^x Siehe Fußnote von Seite 24

Im Gegensatz zu den Verhältnissen auf den Kanälen 13 und 12 sind zwar die Unterschiede in der Peakhöhe auf Kanal 8 und 9 weniger eindrucksvoll, aber dafür bei der Reproduktion völlig identisch.

Ganz anders verhält es sich mit den Emissionsspektren nach der Reinigung mit Aktivkohle. Die Kurvenbilder sind in der Abbildungsreihe IV^{*} wiedergegeben. Die Emissionsspektren sind bei drei getrennten Ansätzen der einzelnen Bakterienstämme eindeutig reproduzierbar.

Der Peak auf Kanal 13 ist bis auf *Streptococcus bovis*, wo er noch schwach angedeutet ist, völlig verschwunden. Das Verhältnis der Peakhöhen auf den Kanälen 8 und 9 ist bei sämtlichen Proben gleich : Der Peak auf Kanal 8 überragt stets den auf Kanal 9 um nahezu ein Drittel. Kennzeichnend für die Unterschiede in den Emissionsspektren der einzelnen Bakterienstämme ist der Fluoreszenzanteil auf den Kanälen 3 bis 7. Während er beispielsweise bei *Streptococcus bovis* und *Pasteurella multocida* wenig in Erscheinung tritt (nur der Peak auf Kanal 7 ist deutlich vorhanden), bestimmt er bei den übrigen Stämmen in unterschiedlicher Intensität das Fluoreszenzspektrum.

Bei der Photomultiplervorspannung von über 0,6 KV sind die Eigenschwingungen des Gerätes so groß, daß die Genauigkeit in Frage gestellt ist und die Kurven nicht mehr ausgewertet werden können. Ein großer Teil der im Versuch getesteten Stämme fällt für die Beurteilung der Eignung des Gerätes aus.

^{*} Siehe Fußnote von Seite 24

da ihr Fluoreszenzsignal stets so gering war, daß zur Darstellung ihrer Emissionsspektren mit einer Verstärkerspannung von mehr als 0,6 KV gearbeitet werden mußte. Davon sind folgende Stämme betroffen: *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus agalactiae*. Vollständigkeitshalber sind sie in der Abbildungsreihe V^x wiedergegeben.

Die Fluoreszenzspektren der abgetöteten Bakterien, die mit einer 0,0003 %igen AO-Lösung angefärbt wurden, verhalten sich ähnlich wie die Spektren aus den Versuchen mit 0,01 %iger AO-Lösung und der Reinigung über Aktivkohle. Diejenigen Proben, die lediglich durch dreimaliges Waschen von dem überschüssigen Farbstoff befreit wurden, zeigen untereinander nur Abweichungen in der Intensitätshöhe auf den Kanälen 3 bis 7, ohne daß diese so ausgeprägt sind wie bei den Stämmen aus der Abbildungsreihe IV. Dagegen reicht die Fluoreszenzintensität sämtlicher Proben, die statt durch Waschen mit Aktivkohle gereinigt wurden, für eine Auswertung nicht aus.

Aus diesen Gründen wurde auf die Wiedergabe der Emissionsspektren verzichtet.

^x Siehe Fußnote von Seite 24

3.2.3.2. Emissionsspektren der lebenden Bakterien

Eine Fluoreszenz war bei allen Präparaten, die nach der Methode der Vitalfärbung hergestellt wurden, nicht nachweisbar. Zumindest mußte stets mit einer Photomultiplervorspannung von über 0,6 KV gearbeitet werden.

Aus den Versuchen mit der Supravitalfärbung läßt sich zusammenfassend sagen, daß die Reproduzierbarkeit nicht so gut und die Differenzen der Kurvenbilder für die verschiedenen Bakterien nicht so ausgeprägt sind, wie bei den Versuchen mit abgetöteten Bakterien, die ebenfalls mittels Aktivkohle vom Farbstoff gereinigt wurden.

3.2.3.3. Emissionsspektren der Bakterienstoffwechselprodukte

Obwohl die einzelnen Lyophilisate unterschiedliche Enterotoxintypen enthielten (A bzw. B), bzw. frei von bekannten Enterotoxintypen waren (Stamm 604), sind ihre Emissionsspektren nach Anfärbung mit FITC völlig identisch. Das bedeutet, daß die Anwesenheit von Enterotoxin das optische Verhalten der Fluoreszenz nicht beeinflußt. Damit erübrigt sich eine spezielle Untersuchung des reinen Enterotoxins verschiedener Typen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob verschiedene Bakterienstämme aufgrund ihrer unterschiedlichen Zellstruktur nach Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff ein Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen ausstrahlen. Die Emissionsspektren wurden mit dem Gerät BIFSA von Messerschmitt-Bölkow-Blohm (genaue Beschreibung des Gerätes unter Ziffer 3.1.1.) gemessen. Durch Vergleich der spektralen Kurvenbilder sollte geprüft werden, ob das Gerät für eine Identifizierung von verschiedenen Bakterien geeignet ist. Der Durchführung der Arbeit lag zunächst die Vorstellung zugrunde, nicht nur komplexes Material, wie es die Bakterienzellen darstellen, zu untersuchen, sondern auch weitgehend reine, organische Substanzen, die gewissermaßen als Modellsubstanzen für Bausteine der Bakterienzelle in die Untersuchungen einbezogen wurden.

Die Unterschiede in den Emissionsspektren der FITC-Konjugate lassen lediglich eine allgemeine Differenzierung zwischen Glykogen und Eiweißen zu. Geringe Abweichungen der Fluoreszenzspektren der einzelnen Eiweißtypen sind zwar unverkennbar, machen aber aufgrund ihres geringen Umfanges eine Eiweißdifferenzierung unmöglich. Die Unterschiede können auf einen Einfluß der Koppelung des Farbstoffes mit der organischen Substanz, wie es WEBER (1952) bei verschiedenen DANS-Konjugaten beobachtete, beruhen oder auch durch eine für die jewei-

lige chemische Substanz typische Farbstoffbindungskapazität bedingt sein. Die Tatsache, daß einerseits die FITC-Konjugate verschiedene Kurvenbilder aufweisen und andererseits jedes erwünschte Spektrum durch geeignete Wahl der Konzentration des freien Farbstoffes erreicht werden kann (Abbildungsreihe I), läßt vermuten, daß die einzelnen organischen Substanzen unterschiedliche Farbstoffmengen binden können und es somit bei den gleichen Substratkonzentrationen zu differierenden Konzentrationen an gebundenem Farbstoff kommt. Die Ergebnisse lassen keinen Schluß zu, welche der beiden Erklärungen bei den untersuchten Substanzen zutreffen.

Da die Anfärbung der organischen Substanzen mit AO stets zu einer Ausfällung der Substanzen führte, was eine Reinigung durch Gelfiltration verhinderte, fiel dieser Farbstoff für diese Versuchsreihe aus. Dagegen erwies sich das AO als einziger brauchbarer Farbstoff für die Versuche mit Bakterien, da sowohl FITC als auch DANS nach Konjugation mit abgetöteten Keimen stets einheitliche Kurvenbilder der Emissionsspektren zeigten.

Das Hauptproblem bei den Versuchen mit AO zur Anfärbung von Bakterien besteht in der Reinigung von dem überschüssigen Farbstoff. Wie die Ergebnisse der Präparate, die durch Gelfiltration gereinigt wurden, zeigen, ist diese Reinigungsmethode nicht zufriedenstellend, da sie nicht zu reproduzierbaren Emissionsspektren führte. Die Tatsache, daß die Ab-

* Siehe Fußnote von Seite 24

weichungen in der Reproduktion ausschließlich auf dem Kanal 13, d.h. im Rotbereich, auftraten, deutet auf besondere Eigenschaften der AO in diesem Bereich hin. Gemäß dem von STRUGGER (1943) beschriebenen Konzentrationseffekt fluoresziert AO nur rot, wenn der Farbstoff in hoher Konzentration vorliegt. ZANKER (1952) konnte anhand seiner Meßergebnisse für die Fluoreszenzspektren des AO nachweisen, daß zwei Bandenschwerpunkte in der Fluoreszenz vorliegen. Der eine liegt mit seinem Maximum bei 534 nm im Grün, der andere bei 655 nm im lagwelligen Rot. Die Grenzform Grün wird bei einer molaren Konzentration von weniger als 10^{-5} erreicht, wogegen die Grenzform Rot erst bei molaren Konzentrationen von mehr als 5×10^{-3} vorliegt. Dazwischen besteht ein Konzentrationsintervall, bei dem die eine Bande im Verhältnis zur anderen gedämpft bzw. verstärkt wird. Visuell wechselt dabei die Fluoreszenzfarbe je nach Konzentration von Grün über Grüngelb - Gelb - Gelborange - Orange - Rotorange nach Rot. Gleichzeitig liegt der Farbstoff bei molaren Konzentrationen unter 5×10^{-5} in der monomeren und dimeren Form vor, während bei molaren Konzentrationen über 5×10^{-5} höhere Assoziationstypen gebildet werden.

Aus dieser Beschreibung geht hervor, daß für die Abweichungen in der Reproduktion der Präparate die höheren Assoziante der AO verantwortlich sind.

Die chemisch-physikalische Gesetzmäßigkeit der AO für die Grenzformen Grün und Rot ist völlig unterschiedlich. Für den

Grünbereich trifft die Spiegelsymmetrieregeln zwischen Absorptions- und Emissionsspektren (LEWSCHIN; 1931) zu, dagegen ist sie für den Rotbereich nicht anwendbar (ZANKER; 1952).

Die Fluoreszenzabklingdauer beträgt für den kurzwelligen Emissionsbereich etwa 5×10^{-9} sec und für den langwelligen 36×10^{-9} sec (SCHMILLEN; 1954). Wichtig für die vorliegende Arbeit ist das unterschiedliche Ausbleichen ("Fading") des Fluoreszenzlichtes des AO. BUSHONG et al. (1968) stellten fest, daß die Fluoreszenzintensität im Bereich über 580 nm sofort abfällt, während die Intensität unterhalb 580 nm zunächst etwas zunimmt und anschließend allmählich nachläßt. Dies wäre eine Erklärung für die Abweichungen der Emissionsspektren in der Reproduktion auf Kanal 13, also in einem Spektralbereich von 642 nm, da hier mit einem progressiven Ausbleichen zu rechnen ist. Eine weitere mögliche Erklärung besteht in der unterschiedlichen Festigkeit der Bindung von AO zum Substrat, in diesem Falle den Bakterien. Die monomeren und dimeren Moleküle des AO gehen eine festere Bindung zum Substrat ein als die höheren Assoziationstypen (BOERNER-PATZELT; 1950). Dadurch wäre es möglich, daß ein Teil der höheren Assoziationstypen, die wie erwähnt für die Rotfluoreszenz bestimmt sind, nach der Reinigung durch Gelfiltration wieder in Lösung gehen und somit zu Verschiebungen in den Emissionsspektren führen.

In diesem Zusammenhang reihen sich auch gut die Ergebnisse der Präparate, die mit Aktivkohle gereinigt wurden, ein. Durch Aktivkohle wird nicht nur der freie, sondern auch der schwach gebundene Farbstoff extrahiert (CHADWICK und NAIRN; 1959, 1960). Sämtliche Präparate fluoreszierten im kurzwelligen Bereich. Die höheren Assoziate des AO, die zu einer Fluoreszenz im langwelligen Spektralbereich führen, müssen demnach so schwach an die Bakterien gebunden sein, daß sie durch das Reinigungsverfahren mit Aktivkohle entfernt wurden. Folglich stimmen auch die Kurvenbilder der einzelnen Bakterienstämme in der Reproduktion völlig überein.

Die Ausnahme bei der Supravitalfärbung (siehe Ziffer 3.2.3.2.) ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Aufnahmefähigkeit der lebenden Bakterien in Abhängigkeit von ihrem Alter zurückzuführen (LEVADITI; 1946).

Andererseits stellten sich bei dem Reinigungsverfahren mit Aktivkohle folgende Nachteile heraus:

- a) Das Fluoreszenzsignal einiger Bakterienstämme (siehe Ziffer 3.2.3.1.) reicht für eine klare Darstellung ihrer Emissionsspektren mit diesem Gerät nicht aus.
- b) Die Kanäle 12 bis 17 bleiben ungenutzt.
- c) Die Emissionsspektren der verschiedenen Bakterienstämme sind nicht so unterschiedlich wie die Spektren der angefärbten und durch Gelfiltration gereinigten Bakterien.

Aus diesen Gründen ist es in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, mit dem Gerät BIFSA verschiedene Bakterienstämme nach Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einer anschließenden Reinigung anhand ihrer Emissionsspektren zu identifizieren. Zwar treten ganz deutliche Unterschiede in den Fluoreszenzspektren der verschiedenen Keime auf, doch sind sie entweder nicht ausreichend reproduzierbar (nach Reinigung mittels Gelfiltration) oder zu gering. Außerdem reicht das Fluoreszenzsignal einiger Stämme für eine klare Darstellung ihrer Emissionsspektren mit dem Gerät BIFSA nicht aus (nach Reinigung mit Aktivkohle).

Trotzdem ist anzunehmen, daß die dem Gerät zugrundeliegende Idee zu positiven Ergebnissen führen kann. Dazu müßte jedoch das Gerät in verschiedener Hinsicht verändert werden. Unbedingt erforderlich wäre eine stärkere Lichtquelle, die zum einen die Fluoreszenzmessung von fluorochromierten Einzelkeimen zuläßt, zum anderen die Messung kleinster Mengen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes erlaubt. Falls weiterhin mit AO als Fluorochrom gearbeitet werden sollte, müßte darüber hinaus eine andere Anordnung der Filter in dem Filterrada getroffen werden. Bei dem in dieser Arbeit getesteten Gerät konnte auf die Kanäle 12 bis 17 verzichtet werden, da im roten Fluoreszenzbereich des AO bei Wiederholungsversuchen die Reproduzierbarkeit aus den geschilderten Gründen nicht in erforderlichem Maße gegeben war. Die Kanäle 1 und 2 fielen ohnehin durch das vorgeschaltete Sperrfilter K 430 aus.

Demnach wird bei AO nur ein Fluoreszenzbereich von etwa 440 bis 620 nm ausgenutzt. Dieser Bereich sollte optimalerweise durch Einsetzen anderer Filter in das Filterrad auf 17 Kanäle verteilt werden, so daß eine feinere Zerlegung der Emissionsspektren erreicht wird. Darüber hinaus wäre in Erwägung zu ziehen, ob nicht auf den Kleincomputer zur Nivellierung der Kurvenbilder (siehe Ziffer 3.1.1.) völlig verzichtet werden kann. Dadurch könnte bei der Messung der Emissionsspektren von fluorochromierten Einzelkeimen nicht nur die spektrale Zerlegung, sondern auch die Intensität, also die Peakhöhe, zur Identifizierung der Bakterien herangezogen werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Gerät BIFSA für eine Identifizierung von Bakterien nach ihrer Fluorochromierung geeignet ist.

Verschiedene Bakterienstämme wurden mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), 1-Dimethylaminonaphthalin-5-Sulfonylchlorid (DANS) und Acridinorange (AO) angefärbt. Dabei stellte sich heraus, daß AO für diese Zwecke am besten geeignet ist.

Das Hauptproblem bei den Versuchen mit AO war die Reinigung der Präparate von überschüssigem Farbstoff. Bei der Reinigung mittels Gelfiltration (Sephadex G 25 coarse) unterschieden sich zwar die Emissionsspektren der verschiedenen Bakterienstämme am stärksten, jedoch waren die Kurvenbilder nicht reproduzierbar. Demgegenüber führte die Reinigung mit Aktivkohle zu reproduzierbaren Ergebnissen. Der Nachteil dieser Methode lag darin, daß die Empfindlichkeit des Gerätes für das sehr schwache Fluoreszenzsignal einiger Bakterienstämme nicht ausreichte, und daß die Unterschiede in den Emissionsspektren verschiedener Bakterien zu wenig ausgeprägt waren. Aus diesen Gründen ist das Gerät in der jetzigen Form und unter Verwendung von AO, dem für diese Zwecke optimalen Fluoreszenzfarbstoff, für die Identifizierung von Bakterien ungeeignet.

Die Versuche zeigten, daß die dem Gerät zugrundeliegende Idee zu positiven Ergebnissen führen könnte, wenn es in verschiedenen Funktionsbereichen verändert wird:

- a) Lichtquelle, die eine Untersuchung von Einzelkeimen und eine Messung kleinster Mengen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes zuläßt.
- b) Einengung des Filterbereiches bei gleichzeitig feinerer Zerlegung des Emissionsspektrums.
- c) Auswertung der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität von angefärbten Einzelkeimen.

Summary

The present dissertation deals with the question whether BIFSA can be used for the identification of bacteria by means of fluorochromation. Various strains of bacteria were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC), 1-dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchloride (DANS), and acridine orange (AO). AO proved to be the most suitable fluorochrome for this purpose. The main problem in the experiments with AO was the separation of the bacteria from excessive dye. Gel filtration (Sephadex G 25 coarse) yielded the most distinct emission spectra of the different bacterial strains, only the diagrams were not reproducible. Over against this, filtration with activated charcoal allowed reproducible results. This latter method, however, had the disadvantage that the sensitivity of BIFSA is insufficient when fluorescent signals of bacterial strains are very weak. Apart from this, the different emission spectra of certain bacterial strains are not distinct enough.

For these reasons, BIFSA in its present form is not suitable for the identification of bacteria by means of AO, the optimum fluorochrome for this purpose.

The experiments showed that the principal idea of BIFSA

could lead to positive results if the equipment is modified:

- a) the light source should permit the investigation of individual germs as well as the accurate examination of smallest amounts of bound fluorochrome.
- b) the range of filtration should be restricted, at the same time the emission spectrum should be diffracted more distinctly.
- c) the equipment should permit to distinguish the different grades of fluorescent intensity of single stained germs.

Literaturverzeichnis

ABBOTT, J.D. and R. SHANNON (1958):

A method for typing *Shigella sonnei* using colicine production as a marker.

J. clin. Path. 11, 71.

ALBRECHT, P. and F. SOKOL (1961):

Fluorescent antibody method.

Optimal conditions for conjugation of 1-dimethylamino-naphthalene-5-sulphonyl chloride with γ -globulin.

Folia microbiol. 6, 49 - 54.

ARMSTRONG, J.A. (1956):

Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence.

Exp. Cell Res. 11, 640 - 643.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA and R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481 - 1485.

BOERNER-PATZELT, D. (1950):

Über ursächliche Faktoren der polychromen Fluoreszenz von Geweben und Gewebestrukturen nach Fluorochromierung mit nur einem Fluorochrom.

Protoplasma, Wien, 39, 639 - 655.

BÖHM, R. (1972):

Persönliche Mitteilung.

BUSHONG, S. C., J. A. WATSON and R. W. ATCHISON (1968):

The changes in fluorescence of acridine orange-stained
hela cells during ultraviolet illumination.

Stain Technol. 43, 273 - 277.

CASMAN, E. P. and R. W. BENNETT (1963):

Culture medium for production of staphylococcal
enterotoxin A.

J. Bact. 86, 18 - 23.

CHADWICK, C. S. and R. C. NAIRN (1960):

Fluorescent protein tracers: The unreacted fluorescent
material in fluorescein conjugates and studies of conjugates
with other green fluorochromes.

Immunol. 3, 363 - 370.

CHADWICK, C. S., R. C. NAIRN and M. G. McENTEGART (1959):

Investigation of the unreacted fluorescent material in fluorescein-
protein conjugates.

Biochem. J. 73, 41.

DARKEN, M. A. (1961):

Natural and induced fluorescence in microscopic organisms.

Appl. Microbiol. 9, 354 - 360.

DONNELLY, C.B., J.E. LESLIE, L.A. BLACK and
K.H. LEWIS (1967):

Serological identification of enterotoxigenic staphylococci
from cheese.

Appl. Microbiol. 15, 1382 - 1387.

FOTHERGRILL, J.E. (1969):

Fluorochromes and their conjugation with proteins.

in: NAIRN, R.C. (1969):

Fluorescent protein tracing, 3. Auflage.

Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 20 - 27.

HAMPERL, H. (1955):

Fluoreszenzmikroskopie.

Münch. med. Wschr. 97, 1121 - 1125.

HESSE, G. und O. SAUTER (1947):

Die pH-Abhängigkeit der Adsorption von Säuren und Basen.

Naturwiss. 34, 251.

HICKS, J.D. and E. MATTHAEI (1955):

Fluorescence in histology.

J. Path. Bact. 70, 1 - 12.

HUI, L., L. TIEN-LIN and L. AI-TE (1964):

The L-form of B. Proteus vulgaris.

II. Cytochemical study of the L-form of B. Proteus, using
Fuelgen's staining method and fluorescence microscopy
with acridine orange.

Sci. sin. 13, 1829 - 1834.

KRIEG, A. (1953):

Fluoreszenzanalyse und Fluorochromie in Biologie
und Medizin.

Klin. Wschr. 31, 350 - 356.

LEVADITI, J.C. (1946):

La microscopie en fluorescence, des virus et des
bactéries.

Biol. méd., Paris 35, 33 - 59.

LEWSCHIN, W.L. (1931):

Das Gesetz der Spiegelkorrespondenz der Absorptions-
und Fluoreszenzspektren.

Z. Physik 72, 368 - 381.

MAC INNES, J.W. and M. McCLINTOCK (1970):

Differences in fluorescence spectra of acridine orange-
DNA complexes related to DNA base composition.

Biopolymers 9, 1407 - 1411.

MAYERSBACH, H. (1958):

Immunhistologische Methoden. II. Ein weiterer Markierungs-
farbstoff: Dimethyl-1-Naphthylaminsulfonsäure-5.

Acta Histochem. 5, 351 - 368.

NAIRN, R.C. (1964):

Fluorescent protein tracing. 3. Auflage.

Livingstone Ltd., Edinburgh and London.

PITAL, A., S.L. JANOWITZ, C.E. HUDAK and
E.E. LEWIS (1966):

Direct fluorescent labeling of microorganisms as a
possible life-detection technique.

Appl. Microbiol. 14, 119 - 123.

SCHMILLEN, A. (1954):

Über die Abklingzeit der Acridinorange-Fluoreszenz.

Z. Naturforsch. 9a, 1036 - 1039.

SCHÜMMELFEDER, N. (1950):

Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und
toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridin-
orange und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der
Zelle.

Virchows Arch. path. Anat. 318, 119 - 154.

SCHÜMMELFEDER, N., K.-J. EBSCHNER und
E. KROGH (1957):

Die Grundlage der differentiellen Fluorochromierung von
Ribo- und Desoxyribonucleinsäure mit Acridinorange.

Naturwiss. 44, 467 - 468.

SCHULER, R. (1952):

Die vitale Darstellung der Chromatinstrukturen von
Bacterium coli mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes.

Naturwiss. 39, 90 - 91.

STRUGGER, S. (1942):

Neues über die Fluoreszenzfärbung toter und lebender
Bakterien.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 50, 51 - 53.

DERSELBE (1943):

Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie.

Verlag M. & H. Schaper, Hannover.

THON (1972):

Persönliche Mitteilung.

WAGNER, M. (1967):

Fluoreszierende Antikörper und ihre Anwendung in der
Mikrobiologie.

VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena.

WEBER, G. (1952):

Polarization of the fluorescence of macromolecules.

Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovines serum
albumin.

Biochem. J. 51, 155 - 167.

ZANKER, V. (1952):

Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate
("reversible Polymerisate") des Acridinorange durch
Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wäßriger
Lösung.

Z. physik. Chem. 199, 225 - 258.

DERSELBE (1952):

Quantitative Absorptions- und Emissionsmessungen am
Acridinorangeduktion bei Normal- und Tieftemperatur im
organischen Lösungsmittel und ihr Beitrag zur Deutung
des metachromatischen Fluoreszenzproblems.

Z. physik. Chem. 200, 250 - 292.

Nach Beendigung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Bremberger von der Firma Messerschmitt - Bölkow - Blohm für die Bereitstellung des Gerätes BIFSA, sowie für die technische Beratung.

Allen Mitarbeitern des Institutes bin ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 29. Juni 1943 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Horst Pflughaupt und seiner Ehefrau Ruth, geb. Kaden in Dresden geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Volksschule und trat anschließend in das Leibniz-Gymnasium in Düsseldorf ein, wo ich im Februar 1965 das Abitur bestand.

Nach einem zweijährigen Wehrdienst bei der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1967 das Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover. 1972 schloß ich das Studium mit dem Staatsexamen ab und erhielt am 29. Dezember 1972 die Approbation als Tierarzt.

